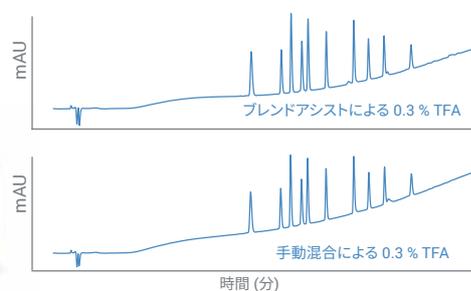


ブレンドアシスト搭載の Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ

ブレンドアシストによる溶媒組成の迅速な最適化と容易な変更



著者

Melanie Metzloff and
Clarissa Dickhut
Agilent Technologies, Inc.

概要

ブレンドアシストを搭載した Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプでは、3 成分または 4 成分グラジエントを使用して緩衝液または修飾剤の濃度を変化させることができます。この技術概要では、ブレンドアシストを次の 2 つのアプローチに使用しました。

- 第 1 のアプローチでは、ブレンドアシスト機能を使用して、ペプチド 10 種標準試料の分離に対する複数のトリフルオロ酢酸 (TFA) 濃度の影響をテストしました。分析結果のリテンションタイム精度を評価して最適なメソッドを特定し、移動相を手動で混合した場合と比較しました。
- 第 2 のアプローチはマルチメソッド実験です。ギ酸アンモニウムの濃度を変化させながら、3 種類の化合物群を連続して分析しました。1260 Infinity II フレキシブルポンプでブレンドアシストを使用することで、どの化合物群についても優れたリテンションタイム精度が得られました。

はじめに

ブレンドアシストは、Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプの駆動部に実装されているソフトウェア機能です。1260 Infinity II フレキシブルポンプの 4 成分混合機能を使用して、原液（緩衝液または修飾剤）をオンライン希釈します。

LC メソッドの開発時には、ブレンドアシストで緩衝液または修飾剤の濃度を変化させ、化合物の分離に最適な条件を見極めることができます。このソフトウェアツールを使用すれば、多様な濃度の緩衝液や修飾剤を混合する手間と時間が省けます。クォータリ LC システムを使用する場合、1 つまたは 2 つのチャンネルに高濃度の緩衝液/修飾剤（原液）を入れて目的の濃度を定義すると、ブレンドアシストによって溶媒が希釈されます¹。

もう 1 つの応用分野としてマルチメソッドアプローチがあります。このアプローチでは、3 種類のサンプル混合物を、それぞれ修飾剤の濃度が異なる 3 つのメソッドで連続して分析します。ブレンドアシストを有効にすることにより、移動相を交換するためにシステムを中断することなく、複数のメソッドを実行できます。

実験方法

装置構成

それぞれの実験には、次のモジュールを使用しました。

- Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104C)、V380 Jet Weaver ミキサー (オプション #070) を搭載
- Agilent 1260 Infinity II バイアルサンプルラ (G7129C)、一体型サンプル冷却器 (オプション #100) を搭載
- Agilent 1260 Infinity II MCT (G7116A)
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 HS (G7117C)、Max-Light カートリッジセルを搭載: セル光路長 10 mm、 $\sigma V = 1.0 \mu L$

ソフトウェア

Agilent OpenLAB CDS (M8413A)

試薬

すべての溶媒は LC グレードを使用しました。超純水は、0.22 μm メンブレンユースポイン

トカートリッジ (Millipak) を装着した Milli-Q Integral システムで製造しました。アセトニトリルは Merk (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。トリフルオロ酢酸 (TFA) およびギ酸アンモニウムは、Sigma-Aldrich 社 (ドイツ、シュタインハイム) から購入しました。

メソッド

表 1. ペプチド 10 種混合物の分析に用いたクロマトグラフィー条件

パラメータ	設定値
化合物	Agilent ペプチド 10 種標準試料 (p/n 5190-0583)
カラム	Agilent AdvanceBio ペプチドマッピング、2.1 × 100 mm、2.7 μm (p/n 655750-902)
溶媒	A) 水 B) アセトニトリル C) 水 + 1 % TFA (溶媒 A 添加物) D) アセトニトリル + 1 % TFA (溶媒 B 添加物)
グラジエント	0 分: 5 %B 4 分: 65 %B
ストップタイム	5 分
ポストタイム	3 分
流量	1 mL/min
注入量	注入量: 2 μL 、ニードル洗浄 3 秒 (60 % アセトニトリル水溶液) サンプル温度: 10 °C
カラム温度	55 °C
DAD	220/4 nm、参照波長 360/80 nm、20 Hz

表 2. サルファ剤、テストステロン混合物、およびシグマペプチド標準試料の分析に用いたクロマトグラフィー条件

パラメータ	設定値		
カラム	Agilent ZORBAX StableBond 80 Å C18、2.1 × 50 mm、1.8 μm 、1200 bar (p/n 857700-902)		
溶媒	A) 水 B) アセトニトリル C) 250 mM ギ酸アンモニウム (溶媒 A 添加物)		
化合物	サルファ剤: スルファニルアミド、スルファアゾール、スルファクロロピリダジン、スルファメタジン (各 100 ng/ μL)	テストステロン混合物: テストステロン c-HIIN 50 ng/ μL および酢酸テストステロン 25 ng/ μL	シグマペプチド標準試料 (Sigma H2016)
ブレンドアシストの設定	200 mM ギ酸アンモニウム (チャンネル A + 添加物 C)	50 mM ギ酸アンモニウム (チャンネル A + 添加物 C)	25 mM ギ酸アンモニウム (チャンネル A + 添加物 C)
グラジエント	0 分 10 %B 0.5 分 10 %B 4 分 30 %B 4.2 分 50 %B	0 分 45 %B 3 分 95 %B	0 分 2 %B 0.5 分 2 %B 6 分 28 %B 7 分 95 %B
ストップタイム	5 分	4 分	7 分
ポストタイム	3 分	3 分	3 分
流量	0.5 mL/min	1 mL/min	0.5 mL/min
注入量	注入量: 1 μL 、ニードル洗浄 3 秒 (60 % アセトニトリル水溶液) サンプル温度: 10 °C	注入量: 5 μL 、ニードル洗浄 3 秒 (60 % アセトニトリル水溶液) サンプル温度: 10 °C	注入量: 2 μL 、ニードル洗浄 3 秒 (60 % アセトニトリル水溶液) サンプル温度: 10 °C
カラム温度	60 °C	30 °C	35 °C
DAD	254/8 nm、参照波長 360/100 nm、20 Hz	254/8 nm、参照波長 360/100 nm、20 Hz	220/8 nm、参照波長 360/100 nm、20 Hz

結果と考察

TFA 濃度の変更によるペプチド 10 種混合物の分離の最適化

アジレントのペプチド 10 種混合物の分離を改善するために、ブレンドアシスト搭載の 1260 Infinity II フレキシブルポンプを使用して、移動相のさまざまな TFA 濃度をテストしました。

TFA 濃度を 0.05 % から 0.3 % に変化させることにより、ペプチドの分離能は明らかに向上しました (図 1)。移動相中の TFA 濃度が 0.05 % のときは、ピーク 4 (ニューロテンシン) とピーク 5 (アンギオテンシン I) が共溶出しましたが、TFA 濃度を 0.2 % にすると、両方のピークがベースライン分離されました。また、TFA 濃度を 0.3 % まで上げることにより、これらのピークの分離能をさらに 1.77 から 2.25 に改善することができました。表 3 に、さまざまな修飾剤濃度下での多様なペプチドの分離能の概要を詳しく示します。

以上より、移動相で 0.3 % の TFA を使用することにより、混合物中のペプチドが十分に分離され、すべてのペプチドの分離能が 2 を超えることがわかりました。

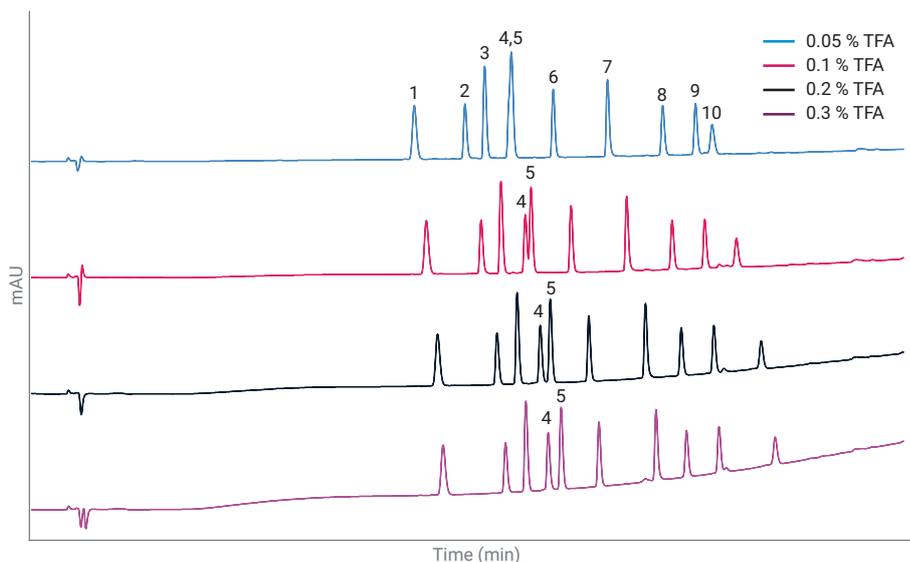


図 1. Agilent ペプチド 10 種標準試料の分離に対する TFA 濃度増加の影響。ブレンドアシストを使用して TFA 濃度を変化させました。

表 3. ブレンドアシストを使用して調製したさまざまな TFA 濃度での分離能の概要

化合物	分離能			
	0.05 % TFA	0.1 % TFA	0.2 % TFA	0.3 % TFA
1.ブラジキニンフラグメント (1-7)	–	–	–	–
2.ブラジキニン酢酸塩	7.27	7.93	8.49	8.80
3.アンギオテンシン II	3.34	3.39	3.42	3.43
4.ニューロテンシン	3.37	4.21	4.05	3.92
5.アンギオテンシン I		0.99	1.77	2.25
6.レニン	6.02	7.07	6.87	6.74
7.[Ace-F-3,-2 H-1] アンギオテンシノーゲン (1-14)	9.88	10.11	10.15	10.24
8.セリン/スレオニンプロテインホスファターゼ (15-31)	9.68	8.01	6.26	5.33
9.[F14] セリン/スレオニンプロテインホスファターゼ (15-31)	5.51	5.59	5.60	5.57
10.メリチン	2.47	5.06	7.45	8.82

次に、TFA 濃度 0.3 % の移動相を手動で調製し、ペプチド 10 種標準試料の分析に使用しました。図 2 に、ブレンドアシストを使用した場合と手動で混合した移動相を使用した場合のクロマトグラムを直接比較します。クロマトグラムはほぼ同じです。表 4 に、リテンションタイム (RT)、RT 精度 (RT RSD)、および分離能の詳細な比較を示します。両方の分析条件で得られた RT と分離能は良好に一致しています。RT 精度については、手動で混合した溶媒を用いた場合の方がわずかに優れていますが、どちらの条件でも、RT RSD は仕様値 0.15 % を明らかに下回っています。

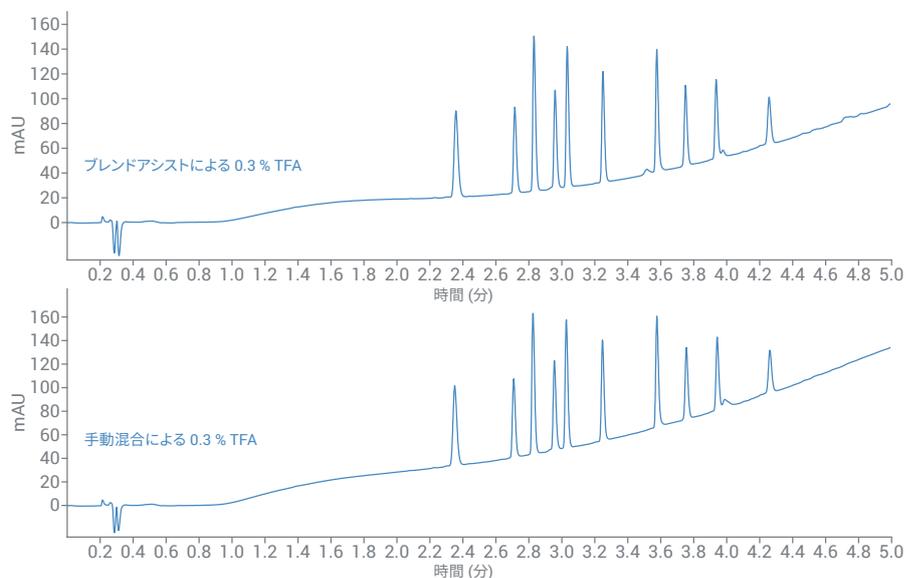


図 2. ペプチド 10 種標準試料の分析にブレンドアシストを使用した場合と使用しない場合のクロマトグラムの比較

表 4. 分析にブレンドアシストを使用した場合と手動で混合した 0.3 % TFA を使用した場合のリテンションタイムと RT RSD の比較。どちらの設定についても、6 回連続分析して得られた結果を計算に使用しています。

ペプチド	ブレンドアシストによる 0.3 % TFA			手動混合による 0.3 % TFA		
	RT (分)	RT RSD (%)	分離能	RT (分)	RT RSD (%)	分離能
1.ブラジキニンフラグメント (1-7)	2.366	0.017	—	2.359	0.008	—
2.ブラジキニン酢酸塩	2.725	0.020	8.80	2.717	0.007	8.73
3.アンギオテンシン II	2.841	0.019	3.43	2.834	0.007	3.42
4.ニューロテンシン	2.970	0.018	3.92	2.965	0.008	3.92
5.アンギオテンシン I	3.044	0.016	2.25	3.037	0.009	2.18
6.レニン	3.261	0.013	6.74	3.258	0.009	6.75
7.[Ace-F-3,2 H-1] アンギオテンシノーゲン (1-14)	3.590	0.018	10.24	3.588	0.010	10.22
8.セリン/スレオニンプロテインホスファターゼ (15-31)	3.764	0.019	5.33	3.768	0.005	5.42
9.[F14] セリン/スレオニンプロテインホスファターゼ (15-31)	3.591	0.016	5.57	3.956	0.005	5.63
10.メリチン	4.272	0.011	8.82	4.275	0.015	8.82

緩衝液濃度の変更による3種類の化合物混合物のマルチメソッド分析

このアプローチでは、3種類のサンプル混合物(サルファ剤、テストステロン混合物、シグマペプチド標準試料)を分析しました。3種類の混合物では、最適に分離するために必要となる水性相中のギ酸アンモニウム濃度がそれぞれ異なります。もちろん、メソッドごとに溶媒を交換して順番に分析することも可能ですが、この技術概要で実施するように、すべての分析を連続して行うこともできます。これは、ブレンドアシストにより、水性相中の緩衝液濃度をメソッドごとにオンラインで変化させることができるためです。

図3は、4種類のサルファ剤(スルファニルアミド、スルファチアゾール、スルファクロロピリダジン、スルファメタジン)の分析結果です。サルファ剤の分離には、修飾剤として200 mMのギ酸アンモニウムを使用しました。すべてのピークについて、きわめて良好なリテンションタイム精度が得られました。

図4は、テストステロン CIII と酢酸テストステロンを6回連続して分析した結果です。この分析では、50 mMのギ酸アンモニウムを水性相に混合するためにブレンドアシストを有効にしました。どちらのピークについても、優れたリテンションタイム精度が得られました。

図5は、シグマペプチド標準試料の分析結果です。分析には、ギ酸アンモニウム濃度が25 mMの水性相を使用しました。仕様値0.15%を優に下回る非常に良好なリテンションタイム精度が得られました。

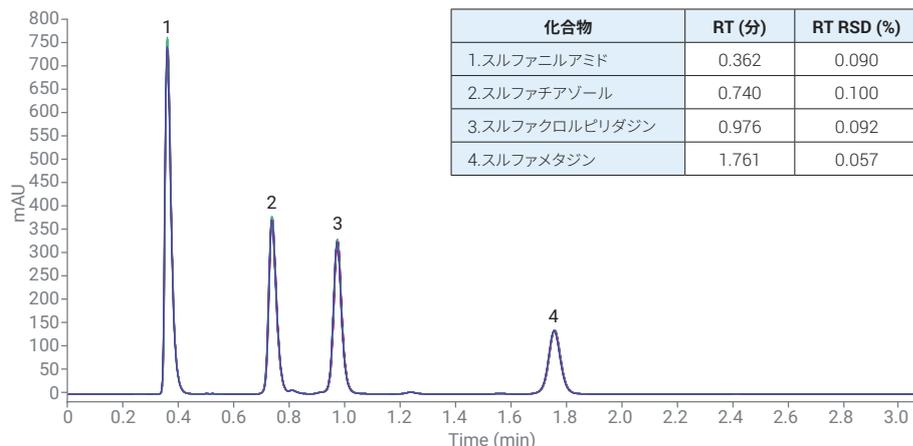


図3. サルファ剤の分離: 6回連続分析結果の重ね表示

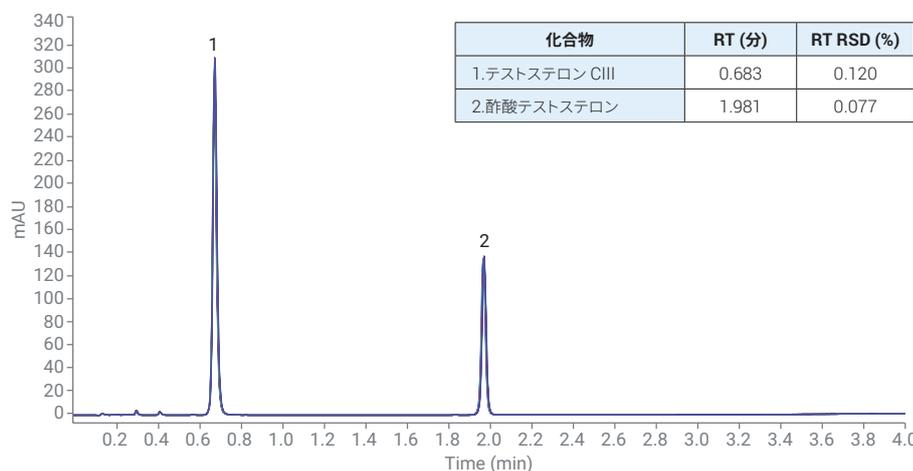


図4. テストステロン CIII および酢酸テストステロンの分離: 6回連続分析結果の重ね表示

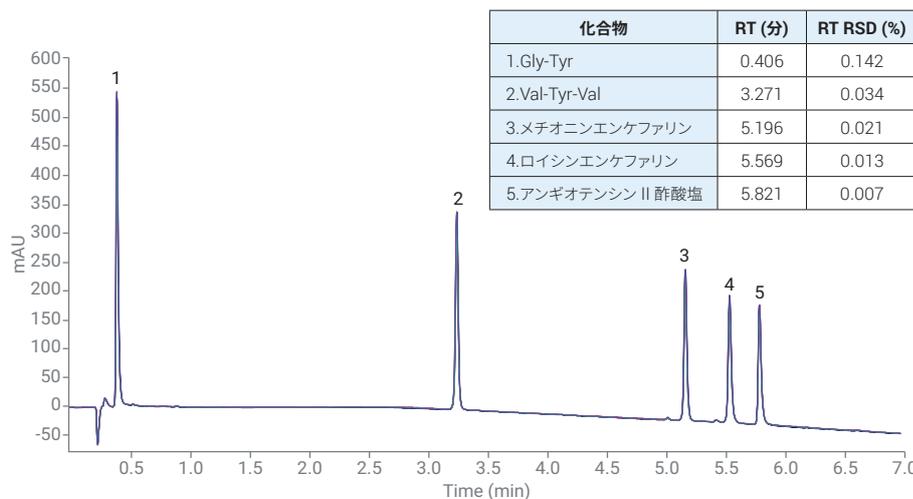


図5. シグマペプチド標準試料の分離: 6回連続分析結果の重ね表示

結論

ブレンドアシスト搭載の Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプでは、修飾剤/緩衝液濃度を簡単に変化させることができるため、さまざまな濃度を手動で混合する必要がありません。この技術概要では、ブレンドアシストの 2 つの使用事例を紹介しました。最初の例では、ペプチド 10 種標準試料の分離を最適化するために、移動相中の TFA 濃度を変化させました。ブレンドアシストを用いて得られたリテンションタイムと分離能は、溶媒を手動で混合した場合と比べて良好に一致しました。

2 番目の例では、修飾剤であるギ酸アンモニウムの濃度を 3 つの方法で変化させることにより、サルファ剤、テストステロン混合物、およびペプチド混合物を連続して分析しました。例として用いた 3 つのすべてのアプリケーションについて、優れたリテンションタイム精度が得られました。

参考文献

1. Huesgen A.G. Fast and Flexible Optimization of Modifier Concentrations Using an Agilent 1290 Infinity LC System with Blend Assist, Agilent Technologies Technical Overview, publication number 5991-2169EN, **2013**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2018
Printed in Japan, March 1, 2018
5991-9088JAJP